

University of Groningen

Renal-specific delivery of antifibrotic drugs using lysozyme

Prakash, Jai

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Prakash, J. (2006). *Renal-specific delivery of antifibrotic drugs using lysozyme: a novel approach for the treatment of renal fibrosis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 10

Samenvatting (Dutch Summary)

Samenvatting

Nier fibrose is een vergevorderd stadium van nierbeschadiging, waarbij er een voortdurende verslechtering van de nierfunctie optreedt. Eén van de belangrijkste kenmerken van nierfibrose is de vorming van littekenweefsel, hoofdzakelijk veroorzaakt door een overmatige productie van extracellulaire matrix en proliferatie van fibroblasten. Het eindstadium van nierfibrose wordt end-stage renal disease (ESRD) genoemd. ESRD patiënten hebben een zo slechte nierfunctie dat nierdialyse of transplantatie noodzakelijk is geworden. Wereldwijd is een toename van het aantal ESRD patiënten gerapporteerd, o.a als gevolg van een toename in ziektes als diabetes en hypertensie. Nierbeschadiging is één van de complicaties die optreden bij deze ziektebeelden. De ontwikkeling van nieuwe therapieën die nierfibrose kunnen remmen is dan ook een belangrijke medische vraagstelling. Dit proefschrift beschrijft hoe renale drug targeting daaraan een bijdrage kan leveren.

In **hoofdstuk 1** wordt de vraagstelling van dit proefschrift behandeld. De afgelopen decennia is de kennis van inflammatoire en fibrotische processen sterk toegenomen, en zijn veel antifibrotische geneesmiddelen voorgedragen. De werkzaamheid van deze verbindingen wordt in veel gevallen belemmerd door bijwerkingen en een slechte distributie van het geneesmiddel naar het nierweefsel. Het uitgangspunt van dit proefschrift is dat drug targeting de balans tussen therapeutische effecten en bijwerkingen kan verbeteren door de weefseldistributie van het geneesmiddel te veranderen ten gunste van de nieren. Een dergelijke nier-selectieve aflevering van het geneesmiddel wordt tot stand gebracht met zogeheten ‘conjugaten’, die gemaakt worden door het geneesmiddel aan een dragermolecuul te koppelen (conjugeren). Het dragermolecuul voor niertargeting dat in dit proefschrift gebruikt wordt is het eiwit lysozym (LZM). LZM hoopt efficiënt op in de niertubuluscellen, en daarmee zal een geneesmiddel dat aan de carrier is gekoppeld dat ook doen. Dit concept wordt al een aantal jaren succesvol toegepast in onze groep. In het huidige onderzoek zijn deze carriers gebruikt om de nieuwste en krachtigste experimentele geneesmiddelen tegen nierfibrose te sturen naar de nier. Hierbij is tevens een nieuwe manier om het geneesmiddel te koppelen aan zijn drager uitgetest.. Het beschreven onderzoek omvat het hele preklinische traject, van ontwerp en synthese van de conjugaten tot het testen in verschillende diermodellen van nierfibrose.

Hoofdstuk 2 en 3 behandelen het conjugaat captopril-LZM, een conjugaat dat al een aantal jaren geleden binnen ons lab ontwikkeld was. Aangezien macromoleculen niet vanuit het maagdarmkanaal geabsorbeerd worden en de eiwitachtige structuur van de carrier in het maagdarmkanaal afgebroken wordt, kunnen geneesmiddel-LZM conjugaten niet via orale toediening gegeven worden. Dit is natuurlijk een nadeel bij chronische ziekten waarbij medicijnen langdurig toegediend moeten worden. Wij hebben daarom gezocht naar een patiënt vriendelijker alternatief voor intraveneuze injectie van de preparaten. **Hoofdstuk 2** laat zien dat LZM en het captopril-LZM conjugaat goed geabsorbeerd worden van de

subcutane injectieplek, en uiteindelijk zelfs beter in de nieren accumuleren dan na intraveneuze injectie. **Hoofdstuk 3** behandelt de studies die uitgevoerd zijn in ratten met een nierbeschadiging ten gevolge van de toxische stof adriamycine. De nierbeschadiging uit zich onder andere in proteïnurie (eiwitverlies in de urine) en therapieën richten zich vooral op het bestrijden van deze proteïnurie. Niet getarget captopril had een verlagend effect op de systemische bloeddruk, maar had geen invloed op de proteïnurie. Subcutaan toegediend captopril-LZM verlaagde juist wel de proteïnurie en veroorzaakte geen bloeddrukdaling. Dit resultaat laat zien dat subcutaan captopril-LZM werkzaam is en dat de nierselectiviteit van het conjugaat verbeterd is ten opzichte van vrij captopril.

In het vervolgonderzoek werd de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die sterker werkzaam zijn dan captopril. Een gemeenschappelijk kenmerk van de geselecteerde geneesmiddelen is dat ze aangrijpen op kinases, eiwitten die intracellulaire processen regelen door middel van phosphorylatie van andere kinases en transcriptiefactoren. Deze geneesmiddelen staan tegenwoordig sterk in de belangstelling omdat ze zeer krachtig zijn en vele processen kunnen remmen. **Hoofdstuk 4** geeft een overzicht van de rol die kinases spelen in nierfibrose, en welke kinase remmers mogelijk geschikt zijn voor de remming van fibrotische processen in de nier. Hierbij is met name aandacht geschonken aan kinases die geactiveerd worden in de niertubuluscellen, het celtype dat ook het doelwit is van onze drug targeting strategie. Tijdens nierziekte worden de tubuluscellen geactiveerd door o.a. groeifactoren en albumine dat door het beschadigde nierfilter in de urine terecht komt. We hebben dit activatie proces in gekweekte tubuluscellen kunnen nabootsen, en aangetoond dat o.a. remmers van de p38 MAPkinase route fibrotische processen remmen (**hoofdstuk 6,7**); maar ook remming van Rho-associated kinase route bleek een veelbelovende antifibrotische strategie (**hoofdstuk 8**).

Een belangrijke technologische ontwikkeling die in dit proefschrift beschreven wordt is een nieuwe bereidingswijze van de geneesmiddel-eiwit conjugaten. Veel farmacologisch interessante geneesmiddelen zijn niet aan eiwitten te koppelen. De synthese van de preparaten is dan technisch niet mogelijk of erg complex. In dit proefschrift is een nieuwe koppelingstechniek toegepast, het zogeheten Universal Linkage System (ULS™). De kern van het ULS is een platina atoom dat coördinatie bindingen kan vormen met het geneesmiddel. ULS werd succesvol toegepast voor de bereiding van alle nierspecifieke conjugaten die in de hoofdstukken 6 t/m 8 behandeld worden. In hoofdstuk 6 wordt verder een vergelijking gemaakt tussen twee koppelingsstrategieën, zoals verderop wordt besproken.

Een belangrijk uitgangspunt van dit onderzoek is dat de werkzaamheid van de geselecteerde kinase remmers verbeterd kan worden middels drug targeting naar de nier. Ter onderbouwing van deze hypothese hebben we de farmacokinetiek van de p38 MAPkinase remmer SB202190 in ratten onderzocht (**hoofdstuk 5**). Dit hoofdstuk beschrijft allereerst de HPLC methode die ontwikkeld werd voor de bepaling van het geneesmiddel in verschillende weefsels, maar laat ook zien dat de weefseldistributie van SB202190 vanuit

het bloed naar de nieren zeer inefficiënt is. De weefseldistributie van hydrofobe kinase remmers kan dus sterk verbeterd worden, en er zal dus ook een therapeutische verbetering mogelijk zijn middels nierspecifieke aflevering.

Dat targeting van SB202190 naar de nier daadwerkelijk mogelijk is wordt behandeld in **hoofdstuk 6**. Voor de synthese van SB202190-LZM conjugaat werden twee verschillende strategieën vergeleken, de al eerder besproken nieuwe ULS methodiek en een andere benadering waarbij een carbamaat van SB202190 gemaakt werd. Het SB-carbamaat-LZM conjugaat werd echter snel afgebroken in serum, en dit type conjugaat zal daarom de nieren niet intact bereiken. Het SB-ULS-LZM conjugaat bleek echter wel stabiel in serum, en na toediening aan ratten hoopte het SB-ULS-LZM inderdaad efficiënt op in de nieren.

Uit de eerdere studies met captopril-LZM was gebleken dat het afgeleverde geneesmiddel snel uit de nieren verwijderd werd. Deze snelle eliminatie beperkt de werkzaamheid van het captopril, of vereist een meer frequente dosering van het conjugaat. De vrijgifte van het SB202190 uit het SB-ULS-LZM conjugaat vertoonde een zogeheten vertraagd afgifte profiel, waarbij gedurende meerdere dagen geneesmiddel in de nieren vrijgegeven werd. Dit vertraagde afgifte profiel is later ook bij andere conjugaten aangetoond, en resulteerde in langdurige beschikbaarheid van het geneesmiddel in de nieren na een enkele dosering. Dit lijkt een gunstig gegeven, omdat nierfibrose een chronische ziekte is, die langdurig behandeld moet worden.

Platina verbindingen zijn berucht voor hun nierbeschadigende werking, en daarom zijn de ULS-conjugaten hierop nauwgezet gecontroleerd. Van SB-ULS-LZM konden echter geen schadelijke effecten worden waargenomen in de gebruikte doseringen, zowel in gekweekte niertubuluscellen als in de nieren van gezonde ratten die met het conjugaat behandeld zijn. Er werden wel therapeutische effecten van SB-ULS-LZM gevonden, zowel in gekweekte tubuluscellen als in zieke ratten (ischemie/reperfusie model) die behandeld werden met SB-ULS-LZM. Een enkelvoudige dosis van het conjugaat had zowel een effect op de activatie van het doelwit kinase (p38 MAPkinase) als op de vorming van de fibrotische marker α -smooth muscle actin (α -SMA).

Eén van de belangrijkste activatoren van niertubuluscellen is transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) en remming van deze activatie route zou dus een efficiënte therapeutische strategie kunnen zijn.. In **hoofdstuk 7** is de nierspecifieke remming van een krachtige TGF kinase remmer (TKI) onderzocht. TKI werd middels ULS aan LZM gekoppeld, en het TKI-LZM conjugaat vertoonde een vergelijkbaar vertraagd afgifte profiel als hierboven beschreven is voor SB-ULS-LZM. De therapeutische effectiviteit van TKI-LZM werd vervolgens onderzocht in het urether-obstructie model, een model waarin afbinding van de urineverzamelbuis leidt tot een snelle nierfibrose. Een enkelvoudige dosis van het conjugaat vertoonde anti-inflammatoire en antifibrotische effecten, zoals o.a. een remming van de infiltratie van immuuncellen in de nier en een verminderde productie van de fibrose marker α -SMA.

Een derde conjugaat was gericht op de remming van RhoGTPase gemedieerde processen in niertubuluscellen (**hoofdstuk 8**). Ook deze activatieroute lijkt belangrijk bij het ontstaan van nierfibrose. De remmer van het ROCK kinase, Y27632, werd opnieuw met ULS aan LZM gekoppeld, en Y27632-LZM conjugaat accumuleerde wederom efficiënt in de nieren. De werkzaamheid tegen nierfibrose werd in het ischemie-reperfusie model getest, nu middels 4 injecties die dagelijks gegeven werden. Deze behandeling van nierfibrose met Y27632-LZM bleek zeer effectief, terwijl vrij Y27632 geen therapeutische effecten vertoonde. Het therapeutisch effect van het conjugaat werd daarom toegeschreven aan de locale remming van ROCK in de nieren, middels de nierspecifieke aflevering met het conjugaat.

Concluderend kan gesteld worden dat het doel van dit onderzoek bereikt is. Middels een nieuwe strategie zijn nieuwe nierspecifieke preparaten ontwikkeld die relevante processen remmen in de doelcellen en de werkzaamheid is in verschillende experimentele modellen aangetoond. De ontwikkelde preparaten zullen in vervolgonderzoek nog verder onderzocht worden. Daarnaast biedt dit proefschrift tal van aanknopingspunten voor nieuw onderzoek, zoals een verdere uitbreiding met andere kinase remmers of andere antifibrotische geneesmiddelen.

